

Rec'd PCT/PTO 13 APR 2005
PCT/KR 03/02162
PCT/KR 16.10.2003

PCT/KR03/2162 10/531271

REC'D 31 OCT 2003

WIPO PCT



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

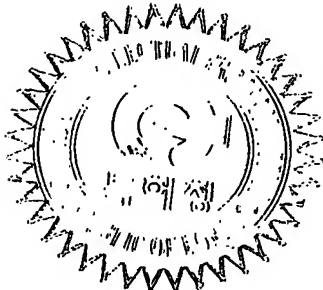
This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원번호 : 10-2002-0063057
Application Number

출원년월일 : 2002년 10월 16일
Date of Application OCT 16, 2002

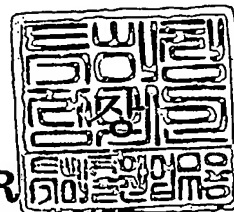
출원인 : (주)바이오니아
Applicant(s) BIONEER CORPORATION

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



2003 년 10 월 16 일

특 허 청
COMMISSIONER



BEST AVAILABLE COPY

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2002.10.16
【발명의 명칭】	올리고뉴클레오티드를 이용한 차량 식별 표지 및 차량 감식 방법
【발명의 영문명칭】	Method for Identifying Car Using Oligonucleotides and Oligonucleotide Marker Used Therein
【출원인】	
【명칭】	(주)바이오니아
【출원인코드】	1-1998-106377-3
【대리인】	
【성명】	서근복
【대리인코드】	9-1998-000293-5
【포괄위임등록번호】	2000-041779-0
【발명자】	
【성명】	박한오
【출원인코드】	4-1998-045762-7
【발명자】	
【성명의 국문표기】	길준모
【성명의 영문표기】	GIL, Jun-Mo
【주민등록번호】	700315-1447016
【우편번호】	363-813
【주소】	충청북도 청원군 남이면 책북리 124
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이상주
【성명의 영문표기】	LEE, Sang-Joo
【주민등록번호】	681025-1474110
【우편번호】	363-813
【주소】	충청북도 청원군 남이면 책북리 124
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

이재돈

【성명의 영문표기】

LEE, Jae-Don

【주민등록번호】

591210-1068329

【우편번호】

363-813

【주소】

충청북도 청원군 남이면 척북리 124

【국적】

KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

김영희

【성명의 영문표기】

KIM, Young-Hee

【주민등록번호】

741209-2386311

【우편번호】

363-813

【주소】

충청북도 청원군 남이면 척북리 124

【국적】

KR

【취지】

특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대리인
서근복 (인)

【수수료】

【기본출원료】

20 면 29,000 원

【가산출원료】

16 면 16,000 원

【우선권주장료】

0 건 0 원

【심사청구료】

0 항 0 원

【합계】

45,000 원

【감면사유】

중소기업

【감면후 수수료】

22,500 원

【첨부서류】

1. 중소기업기본법시행령 제2조에의한 중소기업에 해당함을 증명하는 서류_1통(이하에 명기한 제출서류에 첨부된 것을 원용) [서류명]특허출원서 [출원번호]10-2000-0013464

【요약서】**【요약】**

본 발명은 올리고뉴클레오티드를 이용한 차량 식별 표지 및 차량 감식 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 상전환제(PTA, Phase Transfer Agent)와 결합된 올리고뉴클레오티드 유도체와 이를 표지체로 사용하는 차량 식별 또는 감식 방법에 대한 것이다.

【대표도】

도 1

【색인어】

차량 식별 표지

【명세서】

【발명의 명칭】

올리고뉴클레오티드를 이용한 차량 식별 표지 및 차량 감식 방법{Method for Identifying Car Using Oligonucleotides and Oligonucleotide Marker Used Therein}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 올리고뉴클레오티드를 유기 용매에 녹이고, 페인트에 적용한 후 다시 회수하는 경로를 나타낸 개략도이다.

도2는 올리고뉴클레오티드의 염기부분이나 5'와 3' 위치의 알코올 등이 아마이드 및 에스테르 결합을 한 올리고뉴클레오티드 유도체와 상전환제와의 결합체를 나타낸 도면이다.(R은 페인트의 성분과 용도에 따라 포화탄화수소, 방향족탄화수소, 불포화탄화수소, 헤테로원자가 포함된 포화 또는 불포화 탄화수소이다).

도 3은 올리고뉴클레오티드를 농도별로 희석하여 중합효소연쇄반응(PCR) 수행 후 아가로즈겔에 전기영동한 사진이다.

도 4a는 아클릴로일클로라이드로 보호반응시킨 올리고뉴클레오티드 유도체와 상전환제를 페인트와 혼합하여 피복시키고 회수하여 중합효소연쇄반응 (PCR)수행 후 아가로즈겔에서 전기영동한 사진이다.

도 4b는 도 4a의 올리고뉴클레오티드를 염기서열을 분석한 사진이다.

도 5a는 아세틸클로라이드로 보호반응시킨 올리고뉴클레오티드 유도체와 상전환제를 페인트와 혼합하여 피복시키고 회수하여 중합효소연쇄반응(PCR)수행 후 아가로즈겔에서 전기영동한 사진이다.

도 5b는 도 5a의 올리고뉴클레오티드를 염기서열을 분석한 사진이다.

도 6a는 상전환제와 결합된 올리고뉴클레오티드(A)와 상전환제와 결합된 올리고뉴클레오티드 유도체(B)를 페인트와 혼합하여 피복시키고 회수하여 각각 중합효소연쇄반응(PCR)수행 후 아가로스겔에서 전기영동한 사진이다.

도 6b는 상기 도 6a의 결합체 A와 결합체 B를 염기서열을 분석한 결과를 나타낸다.

도 7a는 서로 다른 염기서열로 이루어진 3종의 올리고뉴클레오티드 유도체-PTA 결합체를 동시에 페인트와 혼합하여 물체에 코팅시키고 회수하여 PCR 수행 후 아가로스겔에서 전기영동한 사진이다.

도 7b는 도 7a의 3종의 올리고뉴클레오티드 유도체-PTA 결합체를 염기서열을 분석한 결과를 나타낸다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<12> 본 발명은 올리고뉴클레오티드를 이용한 차량 식별 표지 및 차량 감식 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 상전환제(PTA, Phase Transfer Agent)와 결합된 올리고뉴클레오티드 유도체와 이를 표지체로 사용하는 차량 식별 또는 감식 방법에 대한 것이다.

<13> 올리고뉴클레오티드는 그 양이 극히 적을지라도 중합효소연쇄반응(PCR)을 통하여 동일한 염기 서열의 올리고뉴클레오티드로 대량 증폭이 가능하고, 증폭된 올리고뉴클레오티드의 염기 서열을 분석을 함으로써 극미량으로 존재하는 원래의 올리고뉴클레오티드의 염기서열을 규명할 수 있다는 독특한 장점이 있다.

- 따라서, 이러한 올리고뉴클레오타이드를 오일이나 페인트, 음식물, 화약 그리고 고가의 예술작품등 다양한 재료 또는 상품에 극미량 첨가함으로써, 상기 재료나 상품의 원래 출처 또는 운반경로 또는 예술 작품의 진품 여부를 정확하게 확인할 수 있다.
- 5> 올리고뉴클레오타이드는 중성 조건에서 탈양자화(deprotonation)에 의해 음전하를 갖는 특성을 가지므로, 다수개의 포스포디에스테르(Phosphodiester)결합으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드 자체는 강한 친수성 (hydrophilic property)을 나타낸다.
- 16> 따라서, 올리고뉴클레오타이드 자체는 수용액에는 잘 녹지만 일반적인 유기 용매에서는 거의 녹지 않게 된다. 이러한 성질은 올리고뉴클레오타이드의 수용액을 제조하는 경우에는 문제가 되지 않으나, 올리고뉴클레오타이드를 유기 용매 속에 용해시킬 경우에는 난용성 문제를 발생시킨다.
- 17> 한편, 이러한 올리고뉴클레오타이드를 물체의 표지(labelling)체로 사용하는 방법들이 개시되어 있다. 예를들면, 국제특허공개 제 W087/06383, W090/14441, W091/17265, W094/04918 등이다.
- 18> W087/06383에서는 뉴클레오타이드를 표지체로 사용할 수 있음을 제시하였지만, DNA 증폭이나, 염기서열 분석(Sequencing)을 통한 물체의 식별 방법은 전혀 기술되어 있지 않았으며, 친수성인 DNA를 유기 용매에 용해시키는 방법은 기재되어 있지 아니하다.
- 19> W090/14441에서는 친수성 올리고뉴클레오타이드를 오일에 녹이기 위해 계면활성제(detergent)를 이용하여 유기 층에 올리고뉴클레오타이드를 도입하는 기술을 개시하였다. 그러나, 상기 특허에서는 특정 프라이머를 사용하여 증폭되는지 여부를 확인함으로써 DNA의 존재를 확인함에 그치며, DNA의 염기 서열의 식별표지 기능에 대해서는 언급하지 아니하고 있다.

- > W091/17265에서는 W090/14441에서 제시된 특정한 프라이머에 의해 유전자가 증폭되는 것으로 염기서열을 확인하는 내용을 개시하면서 올리고뉴클레오티드가 고체 상태의 지지체나 물질과 공유 결합을 할 수 있음을 언급하였다. 그러나, 상기의 특허에 기재된 내용은, 뉴클레오티드를 페인트나 오일에 직접 결합시킨 경우에는, 올리고뉴클레오티드의 추출 회수단계에서 공유결합을 끊어야 함으로서, 결국 염기의 변형을 가져오게 되어 유전자 증폭단계에서 정확한 서열로 증폭이 되지 않는 문제가 발생되어 상업화될 수 없었다.
- 1> W094/04918에서는 좀더 개선된 방법으로 유전자를 증폭하고 염기서열을 분석하며, 올리고뉴클레오티드 이외에 두가지 이상의 발광체 또는 색깔을 나타내는 화합물을 표지체로 사용하는 기술을 개시하였다.
- 22> 그러나, 이 방법 또한 올리고뉴클레오티드의 수산기 또는 염기의 아민기의 반응성을 고려하지 아니하며, 수산기나 아민기부분의 반응으로 인하여 중합효소연쇄반응(PCR)이나 염기서열 분석이 진행될 때 원래의 염기서열을 가진 올리고뉴클레오티드를 얻어내지 못하는 문제점이 발생한다.
- 23> 또한, 상기 특허에 개시된 방법들은 올리고뉴클레오티드를 페인트나 오일 등에 이용할 수 있다고 언급만하고, 이를 이용하여 차량을 DNA 서열정보로 암호화하여 원래의 차량을 추적 및 확인할 수 있는 방법에 대해서는 구체적으로 제시되지 아니하였다.
- 24> 본 출원인은, 이러한 종래 기술의 한계점을 극복하기 위하여 친유성 용매에 대한 용해도를 향상시킨 올리고뉴클레오티드와 이를 사용하는 물체 식별 또는 감식 방법을 대한민국 특허 출원 제2001-0037253호를 통하여 공개한 바 있다. 그러나, 이러한 출원에서는 자동차용 도막 재료와 특히 적절한 상용화성을 갖는 올리고뉴클레오티드를 제시하거나 암시하지 못하고 있으

며, 자동차용 도막에 첨가되어 차량 식별표지나 감식 표지로 사용되기에 적합한 올리고뉴클레오티드를 제공하지 못하였다.

- > 따라서, 갈수록 혼잡해지는 교통과 증가하는 차량으로 인하여 교통사고가 증가함에 따라, 올리고뉴클레오티드를 차량의 도막에 표지물질로서 사용하여 교통사고에 있어서 사고 차량의 도주시 차량을 효과적으로 추적 및 확인할 수 있는 방법의 개발이 시급히 요청되어 왔다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- 6> 따라서, 본 발명의 목적은 상전환제(PTA, Phase Transfer Agent)와 결합된 올리고뉴클레오티드로 이루어진 차량용 식별 표지를 제공하는 것이다.
- 27> 본 발명의 다른 목적은 i) 유기용매 중에서 상전환제와 암호서열영역을 갖는 올리고뉴클레오티드 간에 결합을 형성시키는 단계, ii) 상전환제가 결합된 올리고뉴클레오티드에 반응성 차단 보호기를 결합시켜 반응성을 제거하는 단계, ii) 상기 반응성이 제거된 올리고뉴클레오티드를 차량용 도포 물질에 첨가하는 단계 그리고 iv) 상기 차량용 도포 물질을 차량에 도포하는 단계를 포함하는 차량 식별 표지 방법을 제공하는 것이다.
- 28> 본 발명의 또 다른 목적은 i) 상전환제와 결합된 암호서열영역을 갖는 올리고뉴클레오티드를 반응성 차단기로 보호시킨 표지에 의하여 표지된 차량으로부터 채취된 물질로부터 상기 표지체를 추출하는 단계, ii) 상기의 추출된 표지체에서 올리고뉴클레오티드에 결합된 반응성 차단기를 제거하는 단계, iii) 상기 올리고뉴클레오티드의 염기서열을 분석하는 단계, iv) iii)에서 분석된 서열을 갖는 표지로 표지된 차량을 검색하는 단계를 포함하는 차량 감식 방법을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

- ▷ 상기와 같은 본 발명의 목적은, 상전환제(PTA, Phase Transfer Agent)와 결합된 올리고뉴클레오티드로 이루어진 차량용 식별 표지를 제공함으로써 달성된다.
- ▷ 본 발명에서 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드는 암호서열영역과 암호서열영역 양쪽에 결합된 알려진 PCR용 프라이머로 구성된 것을 사용한다.
- 1▷ 본 발명에 있어서, 상기 차량에 첨가하는 단계는 자동차 도색용 염료, 자동차용 코팅액, 자동차용 락카, 자동차 코팅용 페인트 등 차량 관련 유성제품에 첨가하여 이를 차량에 도포함으로써 차량에 표지하게 된다.
- 32> 본 발명에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드는 반응성 차단기로 보호시킨 올리고뉴클레오티드 유도체 형태를 사용하는 것이 더욱 바람직하며, 상기 올리고뉴클레오티드의 암호서열영역은 10 내지 50 염기쌍 길이를 갖는 것이 사용된다.
- 33> 본 발명에 있어서, 서로 다른 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드로 된 차량 감식 표지체를 각각 2종이상 조합하여 사용할 수 있으며, 바람직하게는 서로 다른 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드로 된 차량 식별 표지체를 각각 3종 조합하여 사용할 수 있다.
- 34> 본 발명의 상전환제로는 4급 암모늄염을 갖는 화합물 또는 양이온계 계면활성제 (cationic surfactant)가 사용되며, 바람직한 실시예에서는 테트라부틸암모늄 하이드로퍼옥사이드 또는 헥사데실 트리메틸 암모늄 브로마이드가 사용되었다.
- <35> 상전환제와 결합된 올리고뉴클레오티드 유도체는 1)유기용매중에서 상전환제와 올리고뉴클레오티드간에 이온 결합을 형성시켜 상전환제가 결합된 올리고뉴클레오티드를 제조하는

단계, 2)상전환제가 결합된 올리고뉴클레오타이드 결합체에 할로젠화 아실(acyl halide)과 같은 반응성 차단 보호기를 결합시켜 반응성을 제거하는 단계를 포함하는 방법으로 제조된다.

> 상기 상전환제는 4급 암모늄염을 갖는 화합물 또는 양이온계 계면활성제 (cationic surfactant)구조를 가지므로, 음이온계의 올리고뉴클레오타이드와 이온 결합을 형성하여 올리고뉴클레오타이드의 음이온 하전 상태를 상쇄시킨다. 상기 촉매와 결합을 통하여 하전이 상쇄된 올리고뉴클레오타이드는 수용성에서 지용성으로 전환되어 유기 용매에 용해될 수 있다.

17> 이와 같이, 유기 용매에 녹는 성질을 갖는 올리고뉴클레오타이드를 유기 용매에 넣어 유성 페인트 등의 친유성 제품에 섞으면 균일한 상태로 분산이 되어 극히 저농도의 올리고뉴클레오타이드를 함유하는 친유성 물체를 제조할 수 있다.

38> 상기 단계 1)에서 얻어진 상전환제와 결합된 올리고뉴클레오타이드는 유기 용매하에서 올리고뉴클레오타이드의 당의 5' 또는 3'의 수산기 또는 염기의 아민기를 할로젠화 아실(acyl halide)과 같은 반응성 차단 보호기와 반응시켜, 수산기 부분은 에스테르화하고, 염기의 아민기는 아마이드화한다.

39> 상기 할로젠화 아실은 유기 용매의 종류 또는 올리고뉴클레오타이드의 사용 용도에 따라서 적절하게 선택할 수 있다. 예를들면, 올리고뉴클레오타이드를 페인트에 단순히 용해시키고자 하는 경우에는 반응성이 없는 치환체를 갖는 할로젠화 아실(예:아세틸클로라이드)을 사용하여 반응성을 차단하고, 오랜 시간동안 유실 방지를 위해서 페인트의 구성수지와 화학적 결합이 요구될 때는 화학 결합을 유도할 수 있는 반응성을 갖는 할로젠화 아실(예:아크릴로일클로라이드)을 이용하는 것이 바람직하다.

- > 또한, 상기의 반응성 차단 보호기는 질소와 아마이드 결합을 하고 산소와 에스테르결합을 하는 카보닐 화합물, N-Si와 O-Si 결합을 하는 실란닐화합물, N-S와 O-Si 결합을 하는 술폰화합물, N-C와 O-C 결합을 하면서 암모니아 처리시 N-C와 O-C 결합이 끊어질 수 있는 포화탄화수소, 방향족탄화수소, 불포화탄화수소, 헤테로원자가 포함된 포화 탄화수소 또는 헤테로원자가 포함된 불포화탄화수소로 이루어진 군에서 선택된다.
- 1> 이러한 이유는 단계1)에서 얻어진 상전환제와 결합된 올리고뉴클레오티드를 유성제품과 그대로 혼합하면 유성 제품의 종류에 따라 상기 유성제품과 화학 반응을 일으켜, 추후 올리고뉴클레오티드 회수 단계에서 상기 올리고뉴클레오티드가 그대로 회수되지 않는 문제가 발생하기 때문이다.
- 12> 따라서, 본 발명에서는 상기 상전환제가 결합된 올리고뉴클레오티드를 유성 물질에 첨가하기 이전에 할로젠화 아실과 같은 반응성 차단 보호기를 도입시켜 반응을 차단시켜, 유성물질 내에서의 화학적 안정성을 확보하므로써, 유성 물질과의 화학결합을 통한 올리고뉴클레오티드의 망실을 줄일 수 있다.
- 43> 본 발명의 다른 목적은 i) 유기용매 중에서 상전환제와 암호서열영역을 갖는 올리고뉴클레오티드 간에 결합을 형성시키는 단계, ii) 상전환제가 결합된 올리고뉴클레오티드에 반응성 차단 보호기를 결합시켜 반응성을 제거하는 단계, ii) 상기 반응성이 제거된 올리고뉴클레오티드를 차량용 도포 물질에 첨가하는 단계 그리고 iv) 상기 차량용 도포 물질을 차량에 도포하는 단계를 포함하는 차량 식별 표지 방법을 제공함으로써 달성된다.
- <44> 본 발명의 또 다른 목적은 i) 상전환제와 결합된 암호서열영역을 갖는 올리고뉴클레오티드를 반응성 차단기로 보호시킨 표지에 의하여 표지된 차량으로부터 채취된 물질로부터 상기 표지체를 추출하는 단계, ii) 상기의 추출된 표지체에서 올리고뉴클레오티드에 결합된 반응성 차단기

를 제거하는 단계, iii) 상기 올리고뉴클레오타이드의 염기서열을 분석하는 단계, iv) iii)에서 분석된 서열을 갖는 표지로 표지된 차량을 검색하는 단계를 포함하는 차량 감식 방법을 제공함으로써 달성된다.

- 5> 본 발명의 방법에서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 암호서열영역과 암호서열영역 양쪽에 결합된 알려진 PCR용 프라이머로 구성된 것을 사용한다.
- 6> 본 발명의 방법에서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 반응성 차단기로 보호시킨 올리고뉴클레오타이드 유도체를 사용하는 것이 더욱 바람직하고, 상기 올리고뉴클레오타이드의 암호서열영역은 10 내지 50 염기쌍 길이를 갖는 것을 사용할 수 있다.
- 17> 본 발명의 방법에서, 서로 다른 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드로 된 표지체를 2종이상 조합하여 사용할 수 있으며, 바람직하게는 서로 다른 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드로 된 표지체를 3종 조합하여 사용할 수 있다.
- 48> 또한, 본 발명의 방법은 상기 중합효소연쇄반응에 의한 증폭 단계 이후 증폭된 올리고뉴클레오타이드를 벡터(vector)에 클로닝하는 단계를 추가로 더 포함할 수 있다.
- 49> 본 발명에 의한 유기 용매에 용해되는 상전환제와 결합된 올리고뉴클레오타이드 및 이들을 반응성 차단기로 보호시킨 올리고뉴클레오타이드 유도체와 상전환제(PTA)결합체는 각종 오일, 페인트, 음식물, 보안시스템 및 차량 등 다양한 분야에 표지체(Marker)로서 응용될 수 있다.
- 50> 특정한 염기서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드를 차량 마커로서 차량 외부 도막에 사용할 경우, 차량 도색용 페인트와 혼합하여 차량에 도색하면, 교통사고시 차량이 도주하였을 경우 차량으로부터 떨어진 조그만 페인트 조각으로부터 올리고뉴클레오타이드를 분리하여 중합효소연

쇄반응으로 증폭시킨 후, 상기 올리고뉴클레오타이드의 염기서열을 분석하면 상기 염기 서열에 해당하는 차량을 추적할 수 있게 된다.

- ▷ 상기의 방법에 있어서, 올리고뉴클레오타이드 서열은 아데닌(A), 시토신(C), 구아닌(G), 티민(T)의 4가지의 염기조합에 의해 암호(식별표지) 기능을 할 수 있게 된다. 예를들면, 올리고뉴클레오타이드의 크기를 40염기쌍으로 하면 양 말단의 15개의 염기쌍 부분은 각각 중합효소연쇄반응(PCR)에 의한 증폭시에 프라이머가 붙는 주형 서열로서 알려진 염기서열로 만들고, 중간 10염기쌍 부분은 상기 4종의 염기에서 선택하여 조합하면 4^{10} 가지의 경우의 수를 얻을 수 있다. 따라서, 10염기쌍 길이의 올리고뉴클레오타이드는 4^{10} 가지의 암호 서열 역할을 할 수 있게 되어 물체마다 암호 서열 영역을 서로 다른 염기서열로 된 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 표지할 수 있게 된다.

- 52> 따라서, 물체로부터 채집된 올리고뉴클레오타이드를 증폭한 후, 염기 서열을 분석하면 암호서열영역 염기서열에 해당하는 원래의 물체를 감식할 수 있게 된다.

- 53> 또한, 차량과 같이 검색되어야 하는 물체가 매우 다수일 때에는 제1올리고뉴클레오타이드, 제2올리고뉴클레오타이드, 제3올리고뉴클레오타이드를 조합하여 사용할 수 있다. 각 올리고뉴클레오타이드의 암호서열 영역이 10염기쌍이라면 4^{10} 가지의 조합을 만들 수 있고, 3종류의 올리고뉴클레오타이드의 암호 서열 영역을 조합하면 $4^{10} \times 4^{10} \times 4^{10}$ 가지의 경우의 수를 얻을 수 있어 아무리 다수의 차량이라도 이러한 조합을 이용하여 확인할 수 있다.

- 54> 여기서, 상기 3종의 올리고뉴클레오타이드의 양말단의 15염기쌍은 서로 다른 프라이머가 사용될 수 있도록 설계하는 것이 좋으며, 이러한 말단 서열이 중간의 암호 서열 영역의 서열과 동일한 서열이 되지 않도록 설계해야 한다.

- > 염기 서열 조합을 통하여 얻어진 암호 서열 영역을 가진 올리고뉴클레오타드를 표지체로서 활용할 경우, 올리고뉴클레오타드의 표지 방법 및 올리고뉴클레오타드 표지체의 분석을 통한 암호서열영역 인식 방법은 다음과 같다.
- 6> 본 발명에 있어서, 올리고뉴클레오타드 염기 서열은 중합효소연쇄반응(PCR)을 통한 증폭을 고려하여 설계한다. 보다 구체적으로는, 암호서열을 부여하는 부분은 10개의 염기쌍의 조합으로 10염기쌍의 올리고뉴클레오타드를 합성(4^{10} 가지의 식별표지가 부여가능)하고, 그 양편으로는 염기 서열이 이미 알려진 15염기쌍의 올리고뉴클레오타드를 연결시켜 결과적으로 40염기쌍의 올리고뉴클레오타드를 합성한다. 염기 서열이 이미 알려진 양말단의 15염기쌍 부분들은 중합효소연쇄반응 (PCR)수행시 전방향 프라이머와 후방향 프라이머에 대한 주형 역할을 하게 된다. 표지하여야 하는 대상에 따라, 암호 서열 영역 부분(10mer)의 염기 서열을 10염기쌍 이상으로 길게 함으로서, 암호 서열 영역의 경우의 수를 늘릴 수 있어서, 더 많은 대상에 식별 표지를 부여할 수 있다.
- 57> 사용하고자 하는 올리고뉴클레오타드는 다음과 같이 설계하였다.
- 58> 1) 암호 서열 영역 서열 디자인
- 59> 기본 디자인 알고리즘은 스미스(Smith)등의 방법을 이용하였다. 먼저 각 올리고머마다 고유의 암호 서열 영역 서열을 무작위로 만들어낸다. 암호 서열을 국부 정렬(local alignment)을 시켜 암호 서열간에 유사성이 존재하는 것들은 제외시키고 서로간에 교차 혼성화(cross hybridization)되는 것들도 제외시킨다 (Smith, T.F., and M.S. Waterman, 1981. Identification of common molecular subsequences. J. Mol. Biol. 147, 195-197).

- > 이같은 과정을 동적 프로그래밍 (dynamic programing)방법으로 구현했으며, 유사성 측정 시 사용한 변수는 미스매치 패널티(mismatch panelty) 3, 매치 스코어(match score) 10, 갭 패널티(gap panelty) 3으로 정했다. 상기 과정을 통하여 얻어진 국부 정렬(local alignment)값이 75보다 낮은 값만을 취하였다. 상기 과정을 통해 암호서열영역의 올리고머 서열을 생성해 냈으며, 결과를 데이터베이스화하였다.
- 1> 2) 가장자리 서열 디자인
- 2> 상기에서와 같이 15염기쌍(15mer)의 올리고머 서열을 무작위로 만들어 낸 후, 그 중에서 녹는점(T_m , Melting Temperature)값이 50 내지 55℃ 사이가 되는 염기 서열만을 선택한다. 이때, 녹는점 값은 인접 빈도(nearest-neighbor)방법으로 구한다(Breslauer, K.J., Frank, R., Blocker, H., and Marky, L.A., 1986, Predicting DNA duplex stability from the base sequence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 3746-3750). 이 방법은 GC값(Guanine-Cytosine content value)을 이용한 방법보다 정확한 것으로 알려져 있다.
- 63> 이같이 얻어진 올리고머는 중합효소연쇄반응(PCR)을 통한 증폭시 서로 교차 혼성화(cross hybridization)되는 경우에 실험에 치명적인 결과를 유발할 수 있다. 따라서, 상기 문제점을 해결하기 위해 전방향 프라이머와 후방향 프라이머간에 국부 정렬(local alignment)를 수행하여 그 값이 50보다 낮은 올리고머를 취하였다. 또한, 왼쪽 올리고머(전방향 프라이머, FOR)값과 암호영역 서열값과 오른쪽 올리고머(후방향 프라이머, REV)의 값의 합이 100보다 낮은 것만을 최종적으로 택하여 서로간의 교차 혼성화(cross hybridization)가 되지 않도록 하였다. 이때 수행되어진 변수는 미스매치 패널티(mismatch panelty) 5, 매치 스코어(match score) 10, 갭 패널티(gap panelty) 5로 정했다.

- 상기와 같이, 디자인된 올리고뉴클레오타드를 자동 올리고뉴클레오타드 합성장치를 이용하여 합성하고 정제한 후 올리고뉴클레오타드 수용액과 유기 용매(톨루엔 또는 에틸에테르 사용)를 상전환제(PTA)와 함께 넣고 충분히 혼합한 후 충분히시킨 다음, 유기용매층만을 분리하고 수용액층에 올리고뉴클레오타드가 자외선(UV)에 보이지 않을 때까지 이 과정을 반복한다.
- > 이 과정을 통해 얻어진 상전환제와 결합된 올리고뉴클레오타드들은 유기 용매에 대하여 균일한 상을 형성하여 극저농도로 유기 용매 내에 분산이 가능하게 된다. 이렇게 함으로써 기존의 수용성인 올리고뉴클레오타드를 간단한 방법으로 지용성으로 바꿀 수 있게 된다.
- 6> 상기 상전환제와 결합된 올리고뉴클레오타드는 친유성 물질, 예를 들어 자동차 피복용 페인트, 락카, 도로 차선 표시용 페인트, 석유, 페인트 희석제, 화약, 천연 오일, 건축용 페인트, 유기 용매, 접착제, 유성 물감, 육류 및 해산물과 같은 유성 제품 중에서 선택하여 사용할 수 있게 된다.
- 37> 그러나, 상전환제와 결합된 올리고뉴클레오타드의 염기의 아민기나 산소 및 당의 수산화기는 친유성 물질의 종류에 따라 상기 친유성 물질과 반응성을 가지게 되어 상기 올리고뉴클레오타드를 친유성 물질에 바로 혼합하게 되면 친유성 물질과 화학 반응을 일으켜서 추후 올리고뉴클레오타드 회수 단계에서 상기 올리고뉴클레오타드가 제대로 회수되지 않는 문제가 발생한다.
- 68> 따라서, 상기 상전환제와 결합된 올리고뉴클레오타드를 친유성 물질에 첨가하기 이전에 할로젠화 아실과 같은 반응성 차단 보호기를 도입하여 친유성 물질과 반응이 가능한 부분을 먼저 보호시키는 반응을 도입시켜 반응성을 차단하는 것이 바람직하다. 본 발명에서는 상기 상전환제와 결합된 올리고뉴클레오타드에 도입시키는 할로젠화 아실로서 반응성이 없는 치환체를 갖는 아세틸 클로라이드를 사용하거나, 페인트의 구성 수지와 강한 화학적 결합이 가능한 치

환체를 갖는 아크릴로일 클로라이드를 사용하였다. 그 결과, 하기 실시예에서 나타나는 것처럼 원래의 올리고뉴클레오티드 모두 회수 가능한 결과를 얻었다.

- > 상전환제와 결합된 올리고뉴클레오티드 유도체를 친유성 물질에 첨가시킨 후, 이들로부터 다시 올리고뉴클레오티드를 회수하는 방법은 다음과 같다. 예를 들면, 상전환제가 결합된 올리고뉴클레오티드 유도체가 첨가된 페인트 조각으로부터 올리고뉴클레오티드를 추출하는 과정은 페인트 조각을 유기 용매로 처리하여 미량의 올리고뉴클레오티드 유도체를 용해시켜 추출한 뒤, 추출된 올리고뉴클레오티드 유도체를 암모니아로 처리하여 반응성 차단 보호기를 제거하여 원래 올리고뉴클레오티드가 갖고 있던 포스포디에스테르 구조로 환원시킨다.
- > 이렇게 추출된 올리고뉴클레오티드로부터 원래의 자동차를 추적 및 확인하는 방법은 다음과 같다. 암모니아로 처리하여 보호기를 제거하여 얻어진 올리고뉴클레오티드를 주형으로 하여 중합효소연쇄반응(PCR)을 통하여 증폭한다. 이 때, 40염기쌍(40mer)의 염기 배열 중 양말단의 15염기쌍(15mer)은 그 서열이 알려져 있으므로 그 염기서열에 맞춰 제작된 프라이머를 각각 전방향 프라이머와 후방향 프라이머로 사용하여 중합효소연쇄반응(PCR)을 통해 증폭한 후, 증폭된 산물을 염기서열 분석반응을 수행함으로써 중앙에 위치한 10염기쌍(10mer)의 염기서열을 밝혀내어 그 서열에 해당하는 식별표지로 표시된 자동차를 추적 및 확인한다. 이러한 과정을 통하여 물체의 정체를 알아낼 수 있게 된다.
- <71> 이하 실시예를 통하여 본 발명의 구성을 보다 구체적으로 설명하지만, 본 발명의 범위가 하기 실시예의 내용으로 한정되는 것은 아니다.
- <72> 실시예 1
- <73> 올리고뉴클레오티드의 농도 결정

페인트와 첨가할 올리고뉴클레오타이드의 농도를 결정하기 위해서 40염기쌍 (40mer) 크기의 올리고뉴클레오타이드를 합성하여 10pmole/ μ l부터 1ztmole/ μ l까지 10배를 단계적으로 희석 (serial dilution)하여 중합효소연쇄반응(PCR)로 증폭하였다. 증폭 후 그 산물을 아가로스겔에서 전기영동하여 그 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3에 나타낸 바와 같이, 올리고뉴클레오타이드의 농도가 1ztmole인 경우에도 중합효소연쇄반응(PCR)을 통하여 잘 증폭됨을 확인할 수 있었다.

> 따라서, 본 실시예에서는 페인트에 첨가할 올리고뉴클레오타이드 양 및 페인트 조각에서 올리고뉴클레오타이드를 분리할 때 망실될 수 있는 양을 고려하여 페인트와 혼합할 올리고뉴클레오타이드 농도를 100atmole로 결정했고 다음 실험에 사용하였다. 도 3에서 각 레인은 올리고뉴클레오타이드 농도를 나타내는 것으로, 레인 1은 10pmole, 레인 2는 1pmole, 레인 3은 100ftmole, 레인 4는 10ftmole, 레인 5는 1ftmole, 레인 6은 100atmole, 레인 7은 10atmole, 레인 8은 1atmole, 레인 9는 1atmole, 레인 10은 100ztmole, 레인 11은 10ztmole, 레인 12는 1ztmole를 나타낸다.

76> 실시예 2

77> 상전환제(PTA)에 의한 올리고뉴클레오타이드의 유기 용매에 대한 용해성 검사.

78> 원하는 염기 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드를 자동 올리고뉴클레오타이드 합성 장치를 이용하여 합성하고 정제한 후, 올리고뉴클레오타이드 수용액과 톨루엔 또는 에틸에테르등의 유기 용매에 상전환제(PTA)와 함께 충분히 혼합한 후 충분히 시킨 다음, 유기용액층만을 분리하고 수층에 존재하는 올리고뉴클레오타이드가 자외선(UV)에 보이지 않을 때까지 이 과정을 반복하였다. 상전환제(PTA)로서 테트라 부틸암모늄 하이드록사이드와 헥사데실 트리메틸 암모늄 브로마

이드를 이용하여 자외선(UV)빛 흡수에 의한 검사를 거친 결과, 상전환제(PTA)를 넣지 않을 때에는 모두 수층 (5ml)에만 용해되어 있던 올리고뉴클레오타드에 상전환제(PTA)를 첨가한 결과 유기용매층(톨루엔 또는 에틸에테르 5ml)에서 추출되는 것을 확인하였다.

- 30> 유기용매층의 추출을 5회 이상(5ml) 반복한 후, 수층을 자외선(UV)으로 검사한 결과, 대부분의 올리고뉴클레오타드는 유기용매층에 용해되고 수층에는 거의 남아 있지 않음을 알 수 있었다. 또한, 유기용매층에 녹아 있는 상전환제(PTA)와 결합된 올리고뉴클레오타드를 말디-토프 질량 분석기(Maldi-Tof mass spectrum)으로 측정한 결과 변함없이 처음의 올리고뉴클레오타드임을 확인하였다.

30> 실시예 3

- 81> 올리고뉴클레오타드에 보호기를 도입시키기 위한 보호반응실험

- 82> 유기층에 용해된 상전환제(PTA)와 결합된 40염기쌍(40mer)의 올리고뉴클레오타드를 페인트에 첨가하기 전에 올리고뉴클레오타드를 보호하기 위한 반응실험을 실시하였다. 실시예 2에서 얻어진 상전환제와 결합된 올리고뉴클레오타드가 함유된 유기용매층을 과량의 아크릴로일 클로라이드와 반응시켰다. 상기 반응을 통하여 생성된 염(salt)을 수용액으로 추출하여 제거한 후, 유기용매층을 말디-토프 질량 분석기(Maldi-Tof mass spectrum)을 이용하여 검사하여 계산된 값에 의하면 염기 하나당 평균 1.8개의 아크릴로일기로 치환되었다. 아크릴로일기는 케톤과 이중결합을 포함하고 있어서 페인트의 수지 성분과 첨가반응을 하여 공유결합을 할 수 있다.

<83> 실시예 4

> 상전환제와 결합된 올리고뉴클레오타이드 유도체와 페인트를 혼합하여 피복시키고 회수하는 실험

> 실시예 3의 과정을 거친 상전환제와 결합된 40염기쌍(40mer)의 올리고뉴클레오타이드 유도체를 자동차용 코팅 락카와 혼합한 다음, 피복시키고 회수하는 실험을 하였다. 자동차용 코팅 락카와 상전환제와 결합된 올리고뉴클레오타이드 유도체를 혼합시킨 후, 유리 표면에 피복한 후, 피복된 락카를 오븐에서 약 80℃ 이상으로 12시간 이상 건조시키고, 상온으로 냉각한 뒤, 세제와 물로 여러 번 세척하였다. 그 후, 락카로부터 다시 올리고뉴클레오타이드를 회수하기 위해서, 남아 있는 락카 조각을 아세트나이트릴과 디메틸포름아미드(dimethylformamide, DMF)로 녹인 후, 락카와 올리고뉴클레오타이드의 염기의 아민기와 당의 수산화기에 결합된 보호기를 제거하기 위해, 80℃에서 12시간 이상 암모니아처리를 거쳤다. 그 후 에틸에테르를 이용하여 락카 성분을 추출하였고 수용액층만을 얻은 뒤, 짧은 Reverse-Phase 컬럼을 통과시켜, 원래의 올리고뉴클레오타이드 형태로 회수하였다. 회수된 올리고뉴클레오타이드를 중합효소연쇄반응(PCR)을 통해 증폭시킨 후, 증폭된 산물을 가지고 염기서열 분석 반응을 수행하였다.

86> 상기 올리고뉴클레오타이드의 중합효소연쇄반응(PCR) 및 염기서열을 분석하는 반응을 다음과 같이 수행하였다. 사용한 40염기쌍(40mer)의 올리고뉴클레오타이드 서열은 5'- ccg cga ggt ggt ggt ctt tgc ggc caa gg -3' 였고, PCR 반응을 수행시 전방향 프라이머의 서열은 5'-agc att ttg tgg ggc-3'(15mer)를, 후방향 프라이머의 서열은 5'-ccc ttg gcc gca aag acc acc acc tcg cgg(29mer)-3' 를 사용하였다. 중합효소연쇄반응(PCR)의 효율을 높이기 위해서 후방향 프라이머의 서열을 15염기쌍(15mer)으로 하지 않고 29염기쌍(29mer)으로 하였다. 중합효소연쇄반응(PCR)을 통하여 증폭된 올리고뉴클레오타이드를 염기서열분석하기 위해서 디엔에이 프렙메이트 II(DNA PrepMate II, ㈜바이오니아 제품)로 정제한 후, 10% 폴리아크릴아마이드 겔에서 직접

적인(direct) 염기서열 분석(sequencing) 반응을 수행하여 염기서열을 분석하였다. 그 결과를 도 4a와 도 4b에 나타내었다. 도 4a는 본 발명에 따라 자동차 코팅 락카와 혼합하여 피복시킨 후 추출하여 중합효소 연쇄반응으로 증폭한 후 아가로스겔에 전기영동한 결과를 나타낸 것이다. 도 4a에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 의해 올리고뉴클레오타이드가 정상적으로 회수됨을 알 수 있었다. 도 4b는 도 4a의 증폭 산물을 염기 서열 분석한 결과를 나타낸다. 도 4b에 나타낸 바와 같이, 처음 염기 서열과 결과 염기서열이 일치함을 알 수 있다. 특히, 전방향 프라이머와 후방향 프라이머를 제외한 암호서열영역을 나타내는 10개(gtg ata gcc t)의 염기서열이 일치함을 확인할 수 있어, 상기 10개의 염기서열을 서로 다르게 식별표지화함으로써 표지체로서 사용할 수 있음을 확인하였다.

7> 그러나, 중합효소 연쇄반응(PCR)을 통한 증폭 산물을 바로 염기서열 분석반응에 적용한 경우 불순물이 나타나 사진이 선명하지 못하였고, 시퀀싱 프라이머가 붙는 위치 바로 다음의 염기가 분석되지 않는 현상이 관찰되어 이후에는 증폭 산물을 바로 염기서열 분석반응을 수행하지 않고 벡터(vector)에 클로닝한 후 염기서열 분석반응을 수행하였다.

38> 처음 염기서열: 5'-agc att ttg tgg ggc gtg ata gcc tcc ttg gcc gca aag a -3'

89> 결과 염기서열: 5'- g ata gcc tcc ttg gcc gca aag acc acc acc -3'

90> 도 4a에서 M은 사이즈 마커, 레인 1부터 레인 7은 100atmole/ μ l 올리고뉴클레오타이드로 실험한 결과를 나타낸다. 도 4b에서 왼쪽의 4개의 레인은 본 발명에 따라 회수한 올리고뉴클레오타이드의 염기서열을, 오른쪽 4개의 레인은 대조군으로서 자동차 코팅용 락카와 혼합하지 않고 그대로 염기서열을 분석한 결과를 나타낸다.

<91> 실시예 5

- > 아세틸 치환체가 붙어 있는 올리고뉴클레오타이드 유도체-PTC 결합체를 페인트와 코팅시키고 회수하는 실험
- > 실시예 3의 과정을 아크릴로일 클로라이드 대신 아세틸 클로라이드를 사용한 것을 제외하고는 동일하게 수행하였다. 그 후, 상전환제와 결합된 40염기쌍 (40mer)의 올리고뉴클레오타이드 유도체를 실시예 4와 같은 과정으로 수행하여 중합효소연쇄반응(PCR)과 염기서열 분석을 수행하였다. 그 후 상기 중합효소연쇄반응 (PCR)을 통하여 증폭된 올리고뉴클레오타이드를 염기서열 분석하기 위해서 디엔에이 프렙메이트 II(DNA PrepMate II, (주)바이오니아 제품)로 정제한 후, T-벡터(vector)로 클로닝하고, 10% 폴리아크릴아마이드 겔에서 T-벡터(vector)내의 T7 프로모터에 상보적인 프라이머를 사용하여 염기서열을 분석하였다. 그 결과를 도 5a와 도 5b로 나타내었다. 도 5a는 자동차 코팅 락카와 혼합하여 코팅시킨 후 추출하여 PCR로 증폭한 결과를 나타낸 것이다. 도 5a에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따라서 올리고뉴클레오타이드가 정상적으로 회수됨을 알 수 있었다. 도 5b는 도 5a의 산물을 염기서열을 분석한 결과로서 처음의 염기서열과 정확히 일치함을 알 수 있었다.
- 94> 처음 염기서열: 5'-agc att ttg tgg ggc gtg ata gcc tcc ttg gcc gca aag a-3'
- 95> 결과 염기서열: 5- ggt ggt ctt tgc ggc caa gga ggc tat cac gcc cca caa aat gct-3'(후 방향(reverse)으로 클로닝 됨)
- 96> 분석 염기서열: 5'-agc att ttg tgg ggc gtg ata gcc tcc ttg gcc gca aag acc acc -3'
- 97> 도 5a에서 M은 사이즈 마커, 레인 1부터 레인 7은 상전환제와 결합된 올리고뉴클레오타이드 유도체를 자동차용 코팅 락카와 혼합한 후, 회수하여 중합효소연쇄반응(PCR)을 통하여 증폭한 후

아가로스젤에 전기영동한 사진이다. 도 5b는 도 5a의 산물을 본 실시예에 따라 염기 서열을 분석한 결과를 나타내는 것으로 본 발명에 따라서 염기서열이 처음서열과 일치함을 알 수 있다

> 실시예 6

- > 상전환제와 결합된 올리고뉴클레오티드(A)와 상전환제와 결합된 올리고뉴클레오티드 유도체를 페인트와 혼합하여 피복시키고 회수하는 실험
- > 실시예 2의 반응을 거친 상전환제와 결합된 올리고뉴클레오티드(A)와 실시예 3의 과정을 거친 상전환제와 결합된 올리고뉴클레오티드 유도체(B)를 페인트의 종류를 달리하여 혼합, 건조 후, 실시예 4에서와 동일한 회수과정을 거친 후, 중합효소연쇄반응(PCR)과 염기 서열 분석 반응을 하였다. 그 결과를 도 6a와 6b에 나타내었다. 도 6a에서 레인 1은 결합체 A를 우레탄 페인트와 혼합한 후 회수한 결과를, 레인 2는 결합체 A를 자동차용 코팅 페인트와 혼합한 후 회수한 결과를, 레인 3은 결합체 B를 자동차용 코팅 페인트와 혼합한 후 회수한 결과를 나타낸 것으로 도면에 나타낸 바와 같이 레인 2의 결합체 A는 제대로 회수가 되지 않았다. 그 후 염기서열 분석반응을 수행하여 염기서열을 분석한 결과 다음과 같았다.

- 01> 예상 염기서열: 5'-agc att ttg tgg ggc tgc ctg gcg ccc ttg gcc gca aag acc acc acc tcg cgg-3'
- 02> 레인 1의 결과 염기서열(A): 5'-agc att ttg tgg ggc tgc ctg gcg ccc ttg gcc gca aag acc acc acc tcg c-3'
- 03> 레인 3의 결과 염기서열(B): 5'-agc att ttg tgg ggc tgc ctg gcg gcc cac aaa atc gt-3'

자동차용 코팅 페인트와 혼합한 후 회수한 결합체A는 중합효소연쇄반응 (PCR)을 통한 증폭 산물을 정제하는 과정 중 아가로스겔에서 전기영동시킨 후 관찰한 결과, 겔에서 밴드가 제대로 형성되지 않았고 T-벡터를 이용하여 클로닝하는 과정에서 클로닝이 되지 않았다. 본 실시예에서 중합효소연쇄반응(PCR)시에 이용한 전방향 프라이머 서열은 agc att ttg tgg ggc이며, 그다음 10개(tgc ctg gcg c)의 서열은 표지체 역할을 하는 서열로서 염기서열이 정확히 일치함을 확인하였다. 후방향 프라이머의 서열은 5-cc ttg gcc gca aag acc acc acc tcg cgg-3'(29mer)를 사용하였다. 결합체 A는 페인트의 종류에 따라 결과가 달랐는데, 우레탄 페인트와 혼합한 경우에는 회수가 잘 되어 후에 염기서열이 잘 분석되었고, 자동차용 코팅 페인트와 혼합한 경우에는 제대로 클로닝이 되지 않아 염기서열을 분석하지 못했다. 이는 아민이나 산소부분의 보호 반응을 수행하지 않아서 올리고뉴클레오타드의 염기가 자동차용 코팅 페인트와 혼합시 직접적으로 반응하여 회수가 잘 되지 않았음을 보여준다. 도 6b에서 왼쪽 4개의 레인은 도 6a 레인 1의 올리고뉴클레오타드 서열을, 중앙의 4개의 레인은 레인 2의 올리고뉴클레오타드 서열을, 오른쪽 4개의 레인은 레인 3의 올리고뉴클레오타드 서열을 분석한 결과를 나타낸다.

05> 실시예 7

06> 서로 다른 3종의 올리고뉴클레오타드를 조합하여 사용

107> 본 실시예에서는 서로 다른 염기서열로 이루어진 40염기쌍(40mer)의 올리고뉴클레오타드를 조합하여 사용하였다. 여기서 각 올리고뉴클레오타드는 서로 다른 프라이머가 사용될 수 있도록 서열을 다르게 하였으며, 중앙의 암호서열 영역부분도 가장자리 서열과 겹치지 않도록 설계하였다. 이렇게 설계된 3종의 올리고머 서열은 다음과 같았다.

- 올리고 서열 1: ctg atg ggc cgc aac ctt cag tac att ttg ggc gca cca t
- > 올리고 서열 2: tca ttc ccc gac cgg agc agt cga tgg cgt ttc acc ggg t
- > 올리고 서열 3: cgc gcg gtg ttg aat tca tgg cca gtg gaa cgc ttt ccg c
- > 각 3종의 올리고뉴클레오티드를 실시예 2와 3의 과정을 수행한 다음, 실시예 4의 과정에 따라 상전환제와 결합된 3종의 올리고뉴클레오티드 유도체를 자동차용 코팅 락카와 함께 혼합하여, 피복하고 건조시킨 후, 다시 피복된 락카로부터 올리고뉴클레오티드를 회수하였다. 회수된 올리고뉴클레오티드를 중합효소연쇄반응을 통해 증폭시켰다. 그 결과를 도 7a에 나타내었다. 여기서 프라이머는 3종의 올리고뉴클레오티드에 맞게 서로 다른 3종의 프라이머 쌍을 사용하였다. 사용된 프라이머 서열은 다음과 같았다.
 - 2> 프라이머 1(전방향: ctg atg ggc cgc aac, 후방향: atg gtg cgc cca aaa)
 - 13> 프라이머 2(전방향: tca ttc ccc gac cgg, 후방향: acc cgg tga aac gcc)
 - 14> 프라이머 3(전방향: cgc gcg gtg ttg aat, 후방향: gcg gaa agc gtt cca)
- 15> 이어서, PCR 증폭산물을 가지고 염기서열 분석 반응을 수행하였다. 그 결과를 도 7b에 나타내었다. 도 7a에서 M은 사이즈 마커를, 레인 1과 레인 2는 프라이머 1로 PCR 증폭한 결과, 레인 3과 4는 프라이머 2로 증폭한 결과, 레인 5와 레인 6은 프라이머 3으로 증폭한 결과를 나타내고, 도 7b에서 왼쪽의 4개의 레인은 올리고뉴클레오티드 1을, 중앙의 4개의 레인은 올리고뉴클레오티드 2를, 오른쪽의 4개의 레인은 올리고뉴클레오티드 3을 나타낸다. 염기서열을 분석한 결과 원래의 올리고뉴클레오티드 서열과 동일함을 확인하였다. 따라서, 3종의 서로 다른 올리고뉴클레오티드를 조합하여 원래의 서열을 확인할 수 있었다. 그러므로, 실제 적용시 서로 다른 서열로 이루어진 2종 이상의 상전환제와 결합된 올리고뉴클레오티드 유도체를 조합

하여 사용할 수 있었다. 따라서, 더욱 많은 조합수가 생성되므로 식별해야 할 물체가 많을 경우 효율적으로 사용될 수 있다.

【발명의 효과】

- > 본 발명은 암호서열영역을 갖는 올리고뉴클레오타이드와 상전환제(PTA, phase transfer agent)가 결합된 차량 감식 표지체를 이용한 차량 식별 표지 및 감식 방법을 제공하는 것이다.
- > 본 발명에 의하면, 유기 용매에 용해되는 상전환제와 결합된 올리고뉴클레오타이드 유도체를 각종 친유성 물질에 첨가시키면, 후에 이들의 물체로부터 다시 올리고뉴클레오타이드를 추출하여 분석함으로써 물체를 추적 및 확인할 수 있다. 즉, 상기 상전환제와 결합된 올리고뉴클레오타이드 유도체를 페인트에 첨가하여 차에 피복하면, 후에 소량의 페인트 파편으로부터 암호서열을 확인하여, 원래의 차량을 추적할 수 있으므로 유용하게 쓰일 수 있으며, 또한 이와 유사한 다양한 용도에 쓰일 수 있다.
- 18> 본 발명의 방법에 의해서, 교통사고 후 사고 차량의 도주시에 차량으로부터 떨어진 페인트 조각으로부터 사고 차량을 추적 및 확인할 수 있게 됨으로써, 소위 교통사고 후 뺑소니 차량 사건의 발생을 억제하고 뺑소니 차량 적발에 결정적인 증거를 확보할 수 있게 된다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

상전환제(PTA, Phase Transfer Agent)와 결합된 올리고뉴클레오티드로 이루어진 차량용 식별 표지.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 상기 차량용 식별표지가 자동차 도색용 염료, 자동차용 코팅액, 자동차용 락 카, 자동차 코팅용 페인트로 이루어진 군에서 선택되는 물질에 첨가되는 것임을 특징으로 하는 차량용 식별 표지.

【청구항 3】

제1항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드가 암호서열영역과 암호서열영역 양쪽에 결합된 중 합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction)에 사용되는 프라이머로 구성된 것임을 특징으로 하는 차량용 식별 표지.

【청구항 4】

제3항에 있어서, 상기 암호서열영역이 10 내지 50 염기쌍으로 이루어진 것임을 특징으로 하는 차량용 식별 표지.

【청구항 5】

제1항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드가 서로 다른 염기 서열을 갖는 2종 이상의 올리고 뉴클레오티드가 조합된 것임을 특징으로 하는 차량용 식별 표지.

【청구항 6】

제5항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타드가 서로 다른 염기 서열을 갖는 3종의 올리고뉴클레오타드가 조합된 것임 특징으로 하는 차량용 식별 표지.

【청구항 7】

제1항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타드에 반응성 차단 보호기가 추가로 더 결합된 것임을 특징으로 하는 차량용 식별 표지.

【청구항 8】

- 1) 유기용매 중에서 상전환제와 암호서열영역을 갖는 올리고뉴클레오타드 간에 결합을 형성시키는 단계;
 - 2) 상전환제가 결합된 올리고뉴클레오타드에 반응성 차단 보호기를 결합시켜 반응성을 제거하는 단계;
 - 3) 상기 반응성이 제거된 올리고뉴클레오타드를 차량용 도포 물질에 첨가하는 단계; 그리고
 - 4) 상기 차량용 도포 물질을 차량에 도포하는 단계;
- 를 포함하는 차량 식별 표지 방법.

【청구항 9】

- 1) 상전환제와 결합된 암호서열영역을 갖는 올리고뉴클레오타드를 반응성 차단기로 보호시킨 표지체로 표지된 차량으로부터 채취된 물질로부터 상기 표지체를 추출하는 단계;
- 2) 상기의 추출된 표지체에서 올리고뉴클레오타드에 결합된 반응성 차단기를 제거하는 단계;

- 3) 상기 올리고뉴클레오타이드의 염기서열을 분석하는 단계;
- 4) 3)에서 분석된 서열을 갖는 표지로 표지된 차량을 검색하는 단계를 포함하는 차량 감식 방법.

【청구항 10】

제9항에 있어서, 상기 염기서열을 분석하기 전에 상기 표지의 올리고뉴클레오타이드를 중합효소 연쇄반응을 통하여 증폭시키는 단계를 추가로 더 포함하는 것을 특징으로 하는 차량 감식 방법.

【청구항 11】

제10항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드를 증폭시키는 단계 이후에 증폭된 올리고뉴클레오타이드를 벡터(vector)에 클로닝하는 단계를 추가로 더 포함하는 것을 특징으로 하는 차량 감식 방법.

【청구항 12】

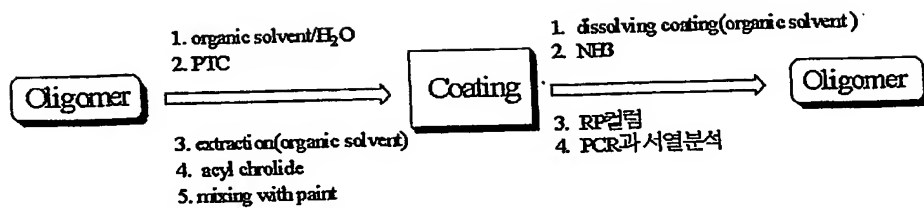
제9항에 있어서, 상기 표지가 서로 다른 염기 서열을 갖는 2종 이상의 올리고뉴클레오타이드가 조합된 것임을 특징으로 하는 차량 감식 방법.

【청구항 13】

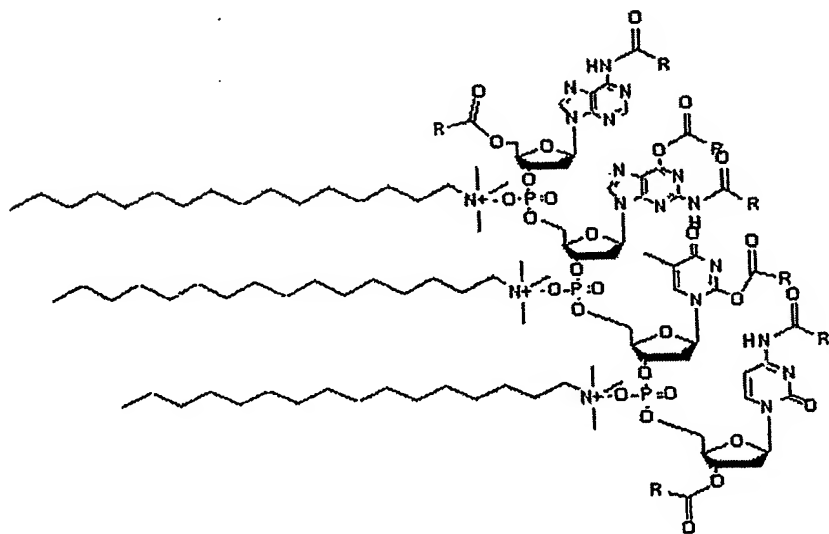
제12항에 있어서, 상기 표지가 서로 다른 염기 서열을 갖는 3종의 올리고뉴클레오타이드가 조합된 것임을 특징으로 하는 차량 감식 방법.

【도면】

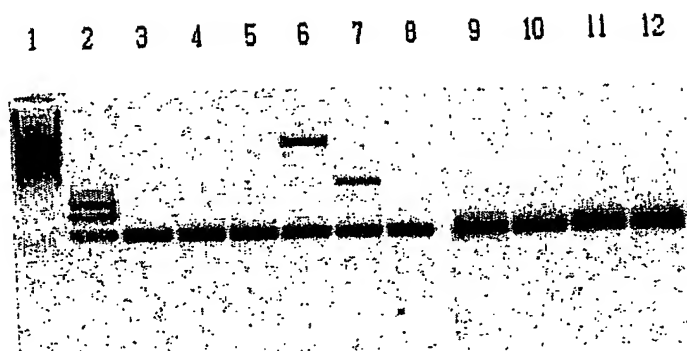
【도 1】



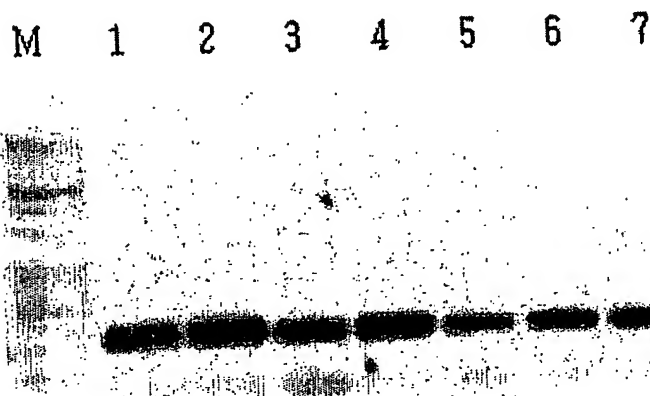
【도 2】



【도 3】



【도 4a】



1020 3057

출력 일자: 2003/10/23

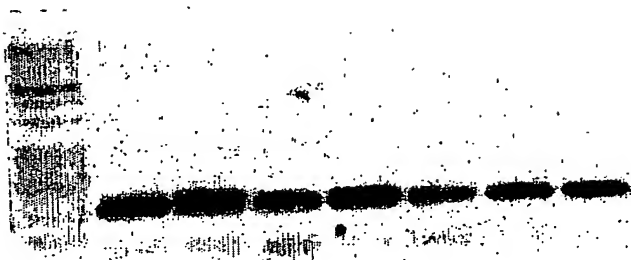
【도 4b】

C T A G C T A G



【도 5a】

M 1 2 3 4 5 6 7



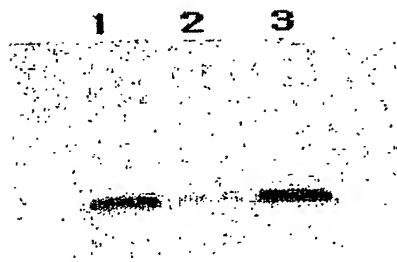
1020 8057

출력 일자: 2003/10/23

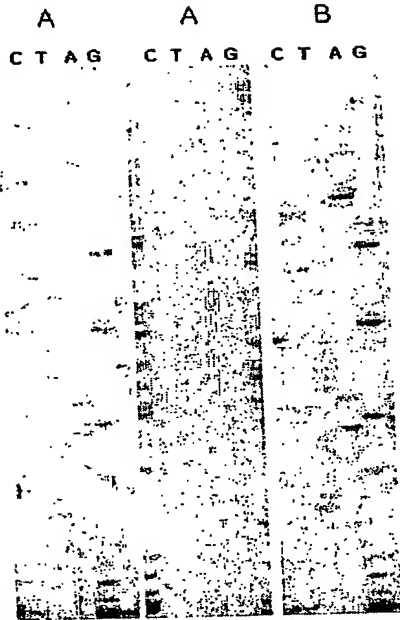
【도 5b】



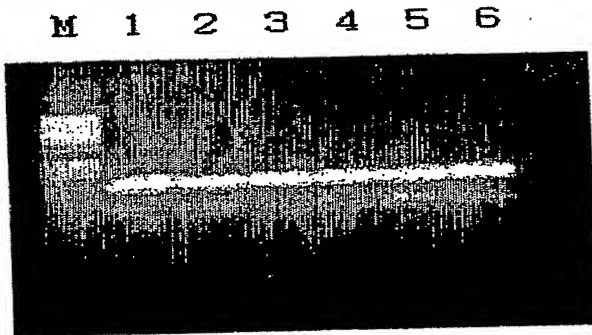
【도 6a】



【도 6b】



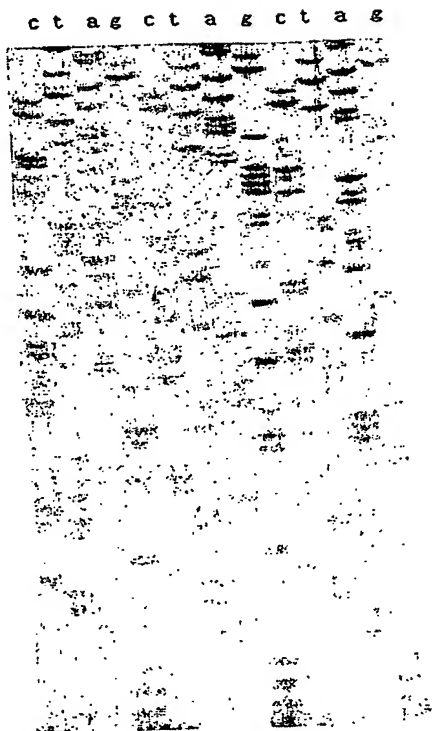
【도 7a】



1020 057

출력 일자: 2003/10/23

【도 7b】



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.